

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

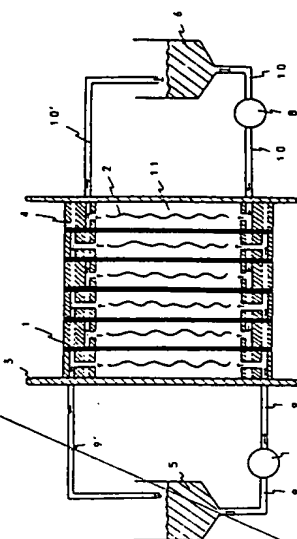
**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**(54) HYDROLYSIS OF OIL AND FAT WITH LIPASE**

(11) 60-126090 (A) (43) 5.7.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-230922 (22) 7.12.1983  
 (71) KAO SEKKEN K.K. (72) MASANOBU TANIGAKI(3)  
 (51) Int. Cl. C12P7/64

**PURPOSE:** To prevent the inactivation of enzyme while keeping the degree of hydrolysis at a high level, and at the same time, to carry out the separation of the reaction product into glycerol and fatty acid, by pouring an oily phase containing lipase as a suspensoid in a cell, and an aqueous phase in the other cell separated from the oily phase cell with a separation membrane, and contacting the enzyme and oil with water through the membrane.

**CONSTITUTION:** For example, the cellulose acetate membranes 1 and the gaskets 4 are arranged alternately in a reactor to form plural cells 11 partitioned from each other with the membranes 1. Water is supplied and circulated from the water-tank 5 through the pump 7 and the lines 9, 9' to the alternate cells 11. At the same time, the cells 11 adjacent to the cells supplied with water are supplied with lipase-suspended oil from the oil tank 6 with the pump 8 through the line 10, 10'. The flow rate of the oil phase and water phase is adjusted so as to apply about 0.2kg/cm<sup>2</sup> pressure to the liquid phase. The oil in the oil phase is decomposed with lipase into glycerol and fatty acid, and the glycerol is transferred into the aqueous phase leaving the fatty acid in the oil phase.

**(54) PRODUCTION OF LIPID COMPONENT HAVING HIGH  $\gamma$ -LINOLEIC ACID CONTENT**

(11) 60-126091 (A) (43) 5.7.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-234295 (22) 14.12.1983  
 (71) NISSHIN SEIYU K.K. (72) YUMIKO KANNOU(1)  
 (51) Int. Cl. C12P7/64, C11C1/04

**PURPOSE:** To obtain a lipid component having high  $\gamma$ -linoleic acid content from cultured product by culturing a microbial strain capable of producing a lipid having high  $\gamma$ -linoleic acid content, in a medium having high carbon source concentration.

**CONSTITUTION:** The above medium having high carbon source concentration is the one containing about 3~10wt% organic carbon source preferably glucose, sodium acetate, etc. The N-source of the medium may be inorganic N-source such as nitrate as well as organic N-source such as yeast extract. The above lipid-producing strain belonging to *Cunninghamella* genus [e.g. *Cunninghamella elegans* (NRRL-1378, 1379, 1380, 1381)] is cultured in the above medium (usually a liquid medium). The cultivation is carried out at about 15~30°C for about 4~15 days. The microbial cells are collected from the cultured product, and the lipid is extracted from the cell by conventional method. A lipid component having high  $\gamma$ -linoleic acid content can be obtained by this process.

**(54) PRODUCTION OF L-ASPARTIC ACID**

(11) 60-126092 (A) (43) 5.7.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 58-234594 (22) 13.12.1983  
 (71) MITSUBISHI YUKA K.K. (72) MASATO TERASAWA(2)  
 (51) Int. Cl. C12P13/20, C12P13/20, C12R1:13

**PURPOSE:** To produce L-aspartic acid in high yield, by treating microbial cell containing aspartase or its immobilized product at a specific temperature under alkaline condition in the presence of L-aspartic acid and  $\text{NH}_4^+$ , and reacting fumaric acid (salt) with  $\text{NH}_3$  (salt) using the treated product.

**CONSTITUTION:** For example, *Brevibacterium flavum* MJ233 is prepared as a bacterial cell having aspartase activity. The cell or the immobilized enzyme of the cell is heated at 40~60°C and 8~11pH for about  $\geq 5$ min in the presence of L-aspartic acid and  $\text{NH}_4^+$ . Fumaric acid or its Na salt, etc. is made to react with  $\text{NH}_3$  or an  $\text{NH}_4$  salt such as  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the presence of the treated microbial cell or its immobilized product to effect the efficient biosynthesis of L-aspartic acid.

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和60年(1985)7月5日

C 12 P 7/64  
C 11 C 1/046760-4B  
6556-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑬ 発明の名称  $\gamma$ -リノレン酸含量の高い脂質成分の製造方法

⑭ 特 願 昭58-234295

⑮ 出 願 昭58(1983)12月14日

⑯ 発 明 者 間 納 由 美 子 横浜市港北区菊名6-7-6

⑰ 発 明 者 瀬 戸 明 横浜市神奈川区中丸1

⑱ 出 願 人 日清製油株式会社 東京都中央区新川1丁目23番1号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

 $\gamma$ -リノレン酸含量の高い脂質成分の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) カニングメラ属に属する $\gamma$ -リノレン酸含量の高い脂質生産菌を炭素源濃度の高い培地で培養し、培養物から $\gamma$ -リノレン酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする脂質成分の製造方法。

(2) 培地の炭素源が有機炭素源である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(3)  $\gamma$ -リノレン酸含量が総脂質の脂肪酸組成の20%以上である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の製造方法。(4) 特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載の方法で得られた脂質成分をケン化分解することとを特徴とする $\gamma$ -リノレン酸含量の高い脂質成分の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はカニングメラ属に属する $\gamma$ -リノレン酸(以下GLAという)含量の高い脂質生産菌を

炭素源濃度の高い培地で培養し、集めた菌体よりGLA含量の高い脂質(中性脂質、極性脂質など)を製造する方法に係る。

これまでに報告されたGLA含有微生物についてはR.O. Mumma [Lipids, 6, 584 (1971)]、R. Shaw [Biochem. Biophys. Acta, 98, 230 (1965)]、鈴木ら(油化学, 30, 863, (1981))などの文献に記されているが、全脂質でのGLA含量は全体に低く、十数%にすぎない。また、最近公告された鈴木らの発明(特公昭58-22199号)ではモルティエラ属の糸状菌を用い、培地に炭化水素を添加することにより、GLA含量が全脂質の脂肪酸組成の20%以上になると報告されている。しかしモルティエラ属の糸状菌が一般のものと比較べ、生育が遅く、特に低温域(低温培養の方がGLA含量は高くなる)における生育は著しく遅いため、生産性の悪さが問題であった。

そこで本発明者らは①GLA含量が高い、②油分含量が高い、③生育速度が早いなどの条件を満

す菌株のスクリーニングを行った結果、カニンガメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*以下 *C. elegans*と記す) (NRR L-1378、1379、1380、1381) が、これにほぼ適合することを見出し、本発明を完成するに至った。本発明で使用する菌は、上述の *C. elegans* が適当であるが、カニンガメラ属に属するものであればすべての菌が使用できる。例えば、カニンガメラブラケスリアナ (*Cunninghamella Blakesleeana*) (NRR L-1373) やカニンガメラ・エチニユレート (*Cunninghamella echinulate*) (NRR L-1383) などである。これらの菌はいずれも米国ノーザンリージョナルリサーチラボラトリー (Northern Regional Research Laboratory) に保存され、カタログに記載されている糸状菌である。

即ち、本発明はカニンガメラ属に属するγ-リノレン酸含量の高い脂質生産菌を炭素源濃度の高い培地で培養し、培養物からγ-リノレン酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする脂質成分の

製造方法である。

培養する際の培地組成については、特に規定するものではないが、グルコース、酢酸ナトリウムなどの有機炭素源が好ましい。またその使用量は3~10重量%程度用いるのが望ましい。窒素源は、酵母エキス、麦芽エキス等の有機窒素源のほか、硝酸塩などの無機窒素源も使用できる。また、これらの組成成分の他、ビタミンB<sub>6</sub>のようなビタミン類の添加も、生育を早めるのに効果的である。

上記糸状菌の培養は、通常液体培地で静置培養、振とう培養、通気攪拌培養などにより行う。培地のPHは微酸性乃至中性が良い。培養温度は15~30℃程度が好ましく、培養期間は4~15日間程度が必要である。このようにして得られた培養物より菌体を集め、その菌体より脂質抽出を行う。GLAを含む脂質が培地中に分泌されることはないので、培地を回収する必要はない。脂質の抽出法については、湿菌体とガラスビーズを混合してn-ヘキサンなどの溶剤とともにホモジナイズする方法や、湿菌体を凍結乾燥後、n-ヘキサン：

イソプロパノール混合溶剤などで抽出する方法などで行われる。また、必要により得られた総脂質を常法によりケン化分解すれば、GLA含量の高い脂肪酸混合物が得られる。

GLAは、リノール酸から動物体内において合成される脂肪酸であり、GLAとなった後にもビスホモγ-リノレン酸を経由してプロスタグランジンE、FおよびE、Fなどに変換されるといふ非常に重要な役割を持つ物質である。最近になり、リノール酸からGLAへの変換反応が、老化、アルコール摂取、ビタミン不足などの要因により著しく阻害されることが見出され、GLAの不足による体内プロスタグランジンバランスの変化がアレルギー疾患、血栓症、ガンなどの原因の一つにあげられるようになっている。

GLAは、月見草種子などのような植物種子中にも微量存在することが知られているが、総脂質の脂肪酸組成のせいぜい10%どまりである。また、このような植物種子油はGLA以外の脂肪酸主成分として70%ほどのリノール酸を含むため

ケン化分解した後の脂肪酸混合物よりGLAを精製する場合、溶剤分別などの手法を用いても、両者が非常によく似た挙動を示すため分離が困難であった。これに対し、本発明によるGLA高含量油は表-1に示すようにGLAに対し、リノール酸のような物理的性質のよく似た脂肪酸が比較的小なく、GLAの精製も容易である。

表-1 *C. elegans*より抽出した  
脂質の脂肪酸組成

| 脂肪酸 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3(r) |
|-----|------|------|------|------|---------|
| %   | 13.2 | 8.1  | 27.1 | 23.6 | 26.1    |

また本発明方法によれば、炭素源はグルコースなどの安全性の確認された有機炭素源を使用できるから、このような場合は、炭化水素を炭素源とする場合に比べ安全性が高いというメリットもある。またカニンガメラ属の菌は、これまでにアフラトキシンなどの有毒物質を生産しないことが確認されている。

実施例1

表-2に示すような有機栄養培地(1ℓ)にC. elegans(NRR L-1378)を接種し、27℃、5日間、100rpmで振とう培養した。培養後、ろ過にて菌体を回収し凍結乾燥した。これにより、培地1ℓあたり2.5gの乾燥菌体を得た。この菌体より、n-ヘキサン:イソプロパノール=3:2(v/v)の混合溶剤で総脂質を抽出したところ、0.4gの脂質が得られた。次に脂質の一部を常法により、ケン化分解し、不ケン化物を除去した後、脂肪酸を得、これをメチルエステル化して脂肪酸組成を分析した。結果を表-3に示す。

表 - 2

|       |       |
|-------|-------|
| 酵母エキス | 2 g/ℓ |
| 麦芽エキス | 2 "   |
| ペプトン  | 3 "   |
| グルコース | 50 "  |

(水で1ℓにする)

表 - 3

| 脂肪酸 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3(r) |
|-----|------|------|------|------|---------|
| %   | 13.2 | 8.1  | 27.1 | 23.6 | 24.5    |

## 実施例2

表-4に示す培地(1ℓ)にC. elegans(NRR L-1378)を接種し23℃、6日間100rpmで振とう培養した。培養後、実施例1と同様に処理した結果、乾燥菌体3.2g、総脂質0.55gが得られた。このものの総脂肪酸組成を表-5に示す。

表 - 4

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 酵母エキス                           | 2 g/ℓ  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 1 "    |
| グルコース                           | 70 "   |
| ビタミンB <sub>6</sub>              | 2 m/ℓ  |
| ビオチン                            | 0.02 " |

表 - 5

| 脂肪酸 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3(r) |
|-----|------|------|------|------|---------|
| %   | 12.0 | 8.5  | 23.1 | 28.0 | 28.5    |

## 手続補正書(自発)

昭和59年8月8日

特許庁長官 志賀 学 殿

## 1. 事件の表示

昭和58年特許願第234295号

## 2. 発明の名称

γ-リノレン酸含量の高い脂質成分の製造方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 チュウオウクシンカワ  
東京都中央区新川一丁目23番1号  
名 称 日清製油株式会社  
代表者 普川 光 男

尚、本件に関する連絡は、下記住所へお願い致します。

住 所 ㊦221 神奈川県横浜市神奈川区千若町1  
名 称 日清製油株式会社 研究所  
電 話 045(461)0181

## 4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲および発明の詳細な説明  
の欄

## 5. 補正の内容

- (1) 明細書第4頁第5行において「3~10重量%」とあるを「3~20重量%」と訂正する。
- (2) 同第5頁第8行において「E、FおよびE、F」とあるを「E<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>およびE<sub>2</sub>、F<sub>2</sub>」と訂正する。
- (3) 同第8頁表-4において「2 m/ℓ」とあるを「2 mg/ℓ」と訂正する。
- (4) 同第8頁実施例2の表-5の後に別紙(1)のような内容の実施例3を追加する。
- (5) 特許請求の範囲を別紙(2)のとおり訂正する。

## 別紙(1)

## 実施例3

表-6に示す培地(30ℓ)を50ℓのジャーファーマンターに入れ、加熱加圧殺菌後、*C. elegans* (NRRL-1378)を接種し、28℃、5日間の通気攪拌培養を行った。なお、培地のpHは、常に4.0以上となるよう調節した。

表-6

|   |        |                                     |        |
|---|--------|-------------------------------------|--------|
| グルコース   | 150g/ℓ | FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 20mg/ℓ |
| 酵母エキス   | 1 "    | CaCl <sub>2</sub>                   | 20 "   |
| 麦芽エキス   | 1 "    | CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O | 0.5 "  |
| 尿 素   | 5 "    | ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 3 "    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5 "    | MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O | 3 "    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 5 "    | ビタミンB <sub>12</sub>                 | 6 "    |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O             | 1 "    | ビオチン                                | 0.06 " |
| NaCl  | 0.3 "  |                                     |        |

培養後、実施例1と同様に処理した結果、乾燥菌体1480g、総脂質520gが得られた。このものの総脂肪酸組成を表-7に示す。

表-7

| 脂肪酸 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 (γ) |
|-----|------|------|------|------|----------|
| %   | 11.0 | 7.6  | 24.5 | 28.9 | 26.3     |

このようにして得られた総脂質を常法によりケン化分解し、不ケン化物を除去した後、脂肪酸を集めたところ、400gの総脂肪酸が得られた。

## 別紙(2)

## 特許請求の範囲

- (1) カニンガメラ属に属するγ-リノレン酸含量の高い脂質生産菌を炭素源濃度の高い培地で培養し、培養物からγ-リノレン酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする脂質成分の製造方法。
- (2) カニンガメラ属に属するγ-リノレン酸含量の高い脂質生産菌がカニンガメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。
- (3) 培地の炭素源が有機炭素源である特許請求の範囲第1項記載の製造方法。
- (4) γ-リノレン酸含量が総脂質の脂肪酸組成の20%以上である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の製造方法。
- (5) 特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載の方法で得られた脂質成分をケン化分解することを中心とするγ-リノレン酸含量の高い脂質成分の製造方法。